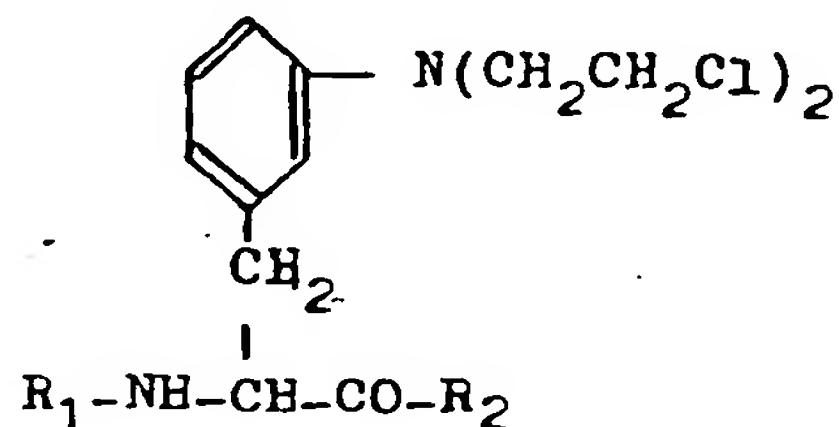


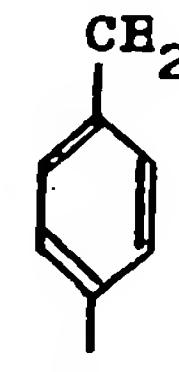
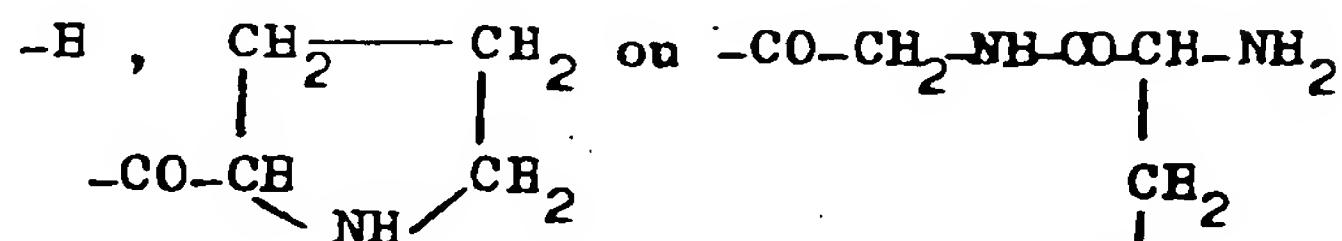
ENGLISH ABSTRACT OF FR 2,094,175

The invention concerns synthetic peptides having a noticeable activity in tumor related chemotherapy and a method of preparing same.

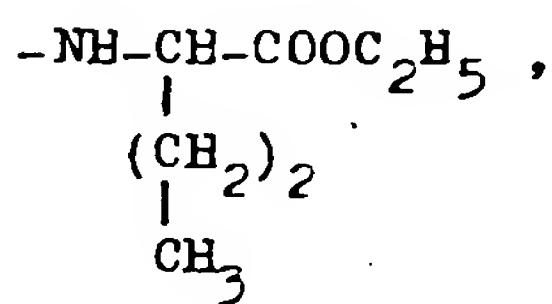
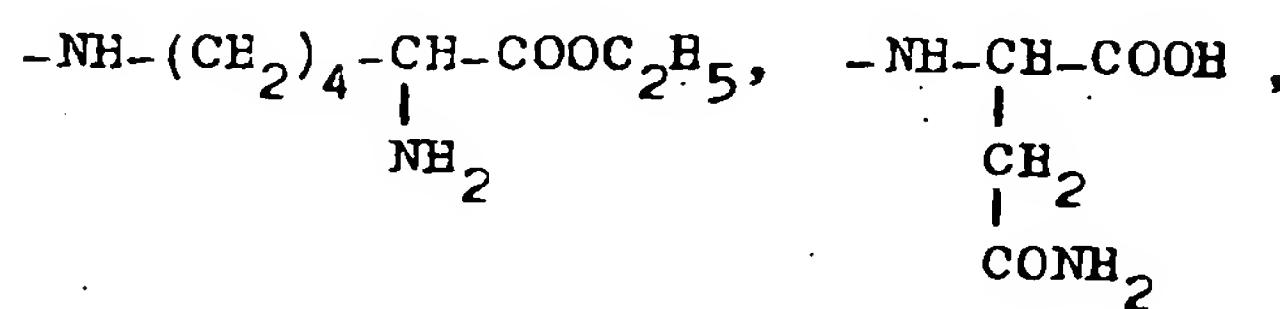
The synthetic polypeptides have the following formula:



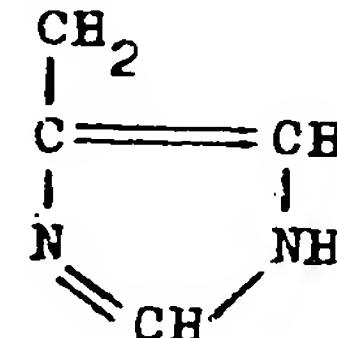
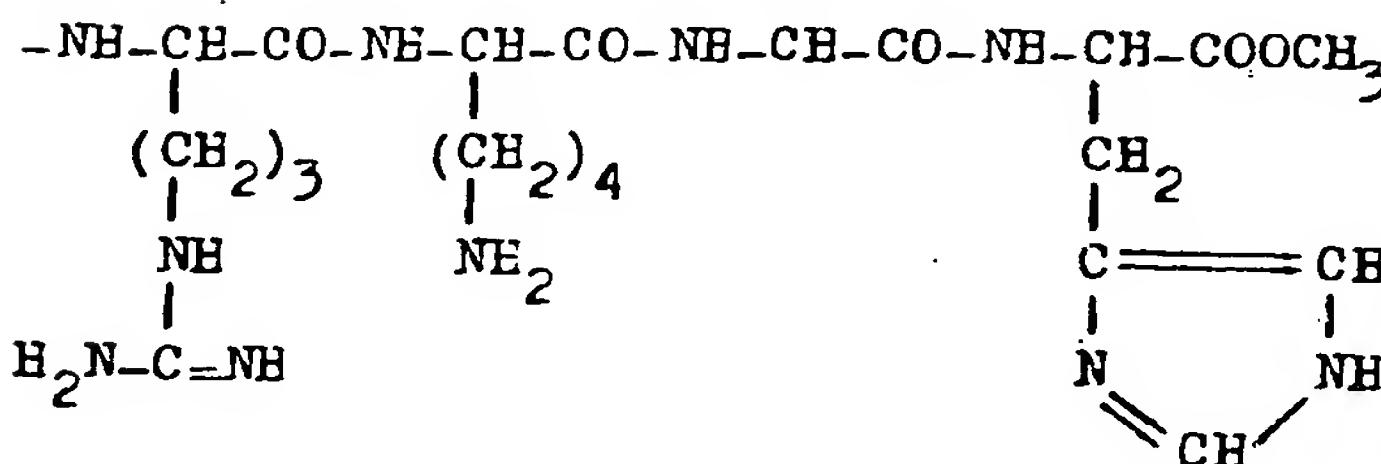
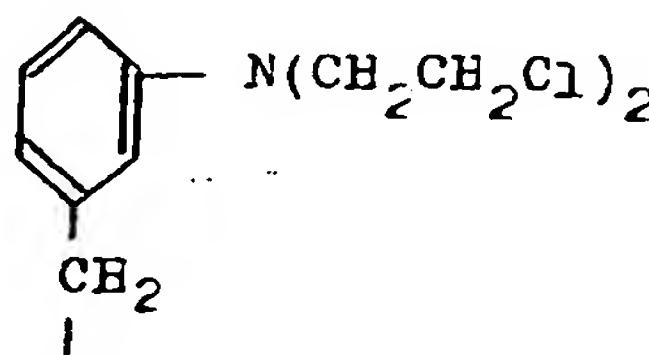
wherein R_1 is



R_2 is $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$ (it est $-\text{CH}_3$ or $-\text{C}_2\text{H}_5$),



or



THIS PAGE BLANK (USPTO)

It has been found that mixtures of compounds of the above formula are highly effective.

The general formula indicates that a molecule of m-di(2-chloroethyl)aminophenyl-L-alanine is bonded through at least one peptide bond to at least one of the defined aminoacids.

In addition the following features must be met:

- 1) the single aminoacids used in the synthesis must be of L-configuration
- 2) the following well defined peptide sequences have been investigated

- a) L-prolyl-m-di(2-chloroethyl)aminophenyl-L-alanine
- b) N, ϵ [m-di(2-chloroethyl)aminophenyl-L-alanyl]-L-lysine
- c) m-di(2-chloroethyl)aminophenyl-L-alanyl-L-asparagine
- d) p-fluoro-L-phenylalanine-glycyl-m-di(2-chloroethyl)aminophenyl-L-alanyl-L-norvaline
- e) m-di(2-chloroethyl)aminophenyl-L-alanyl-L-arginyl-L-lysyl-m-di(2-chloroethyl)aminophenyl-L-alanyl-L-histidine.

The method of preparation of these compounds is described as well as the antitumor activity determined (Tables). The dependent claims 2 5 to 6 are directed to these specific compounds, especially their ethyl or methyl esters.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) **N° de publication :**
(A utiliser que pour
le classement et les
commandes de reproduction.)

2.094.175

(21) **N° d'enregistrement national :**
(A utiliser pour les paiements d'annuités,
les demandes de copies officielles et toutes
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

70.29723

(13) **DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

1^{re} PUBLICATION

(22) Date de dépôt..... 12 septembre 1970, à 16 h 10 mn.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — «Listes» n. 5 du 4-2-1972.

(51) Classification internationale (Int. Cl.) .. A 61 k 27/00//C 07 c 103/00.

(71) Déposant : ISTITUTO SIEROTERAPICO MILANESE «SERAFINO BELFANTI», résidant
en Italie.

Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Plasseraud, Devant, Gutmann, Jacqueline Lemoine.

(54) Peptides synthétiques utilisables pour inhiber la croissance de tumeurs, et procédé pour
leur préparation.

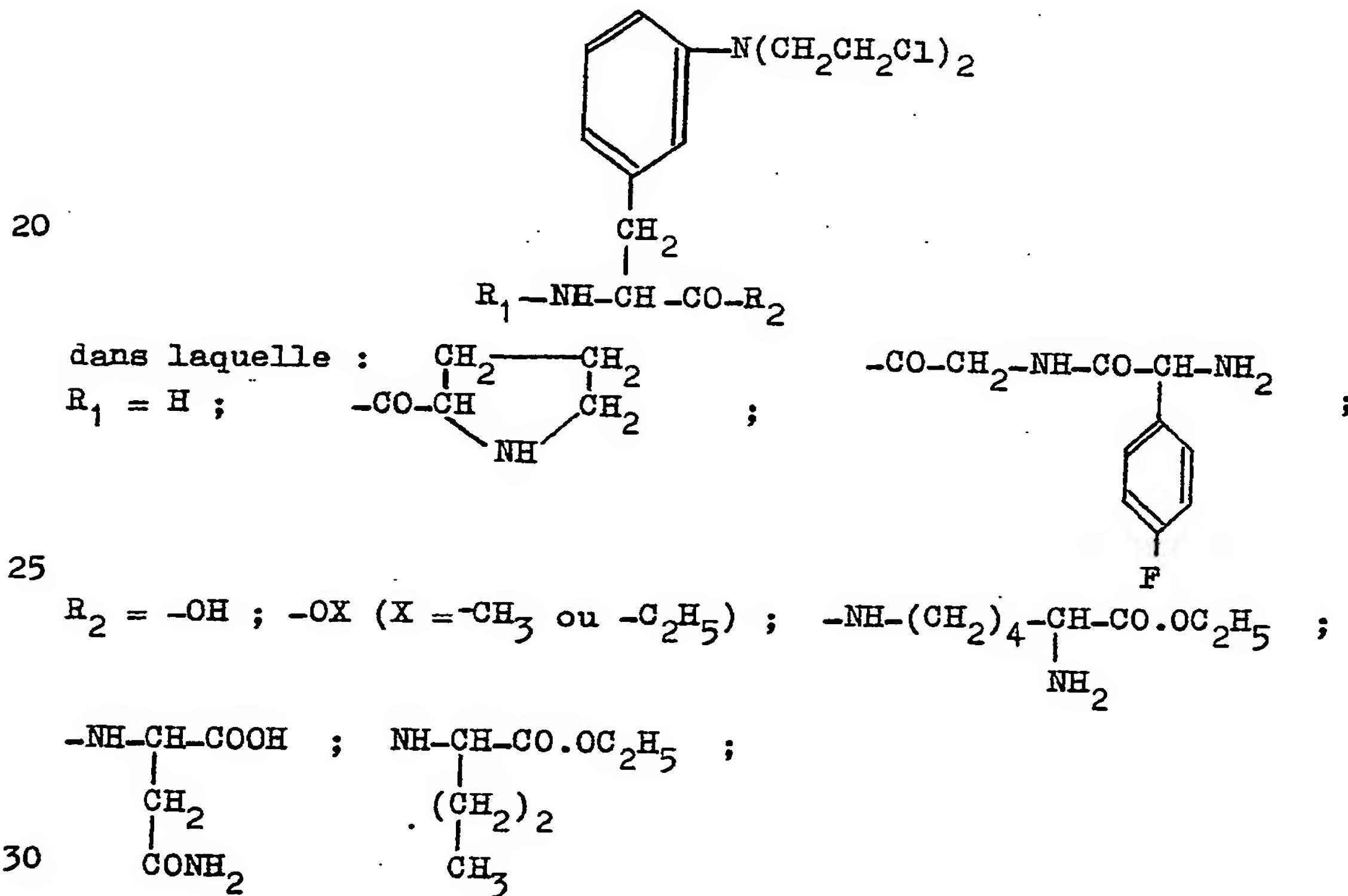
(72) Invention de :

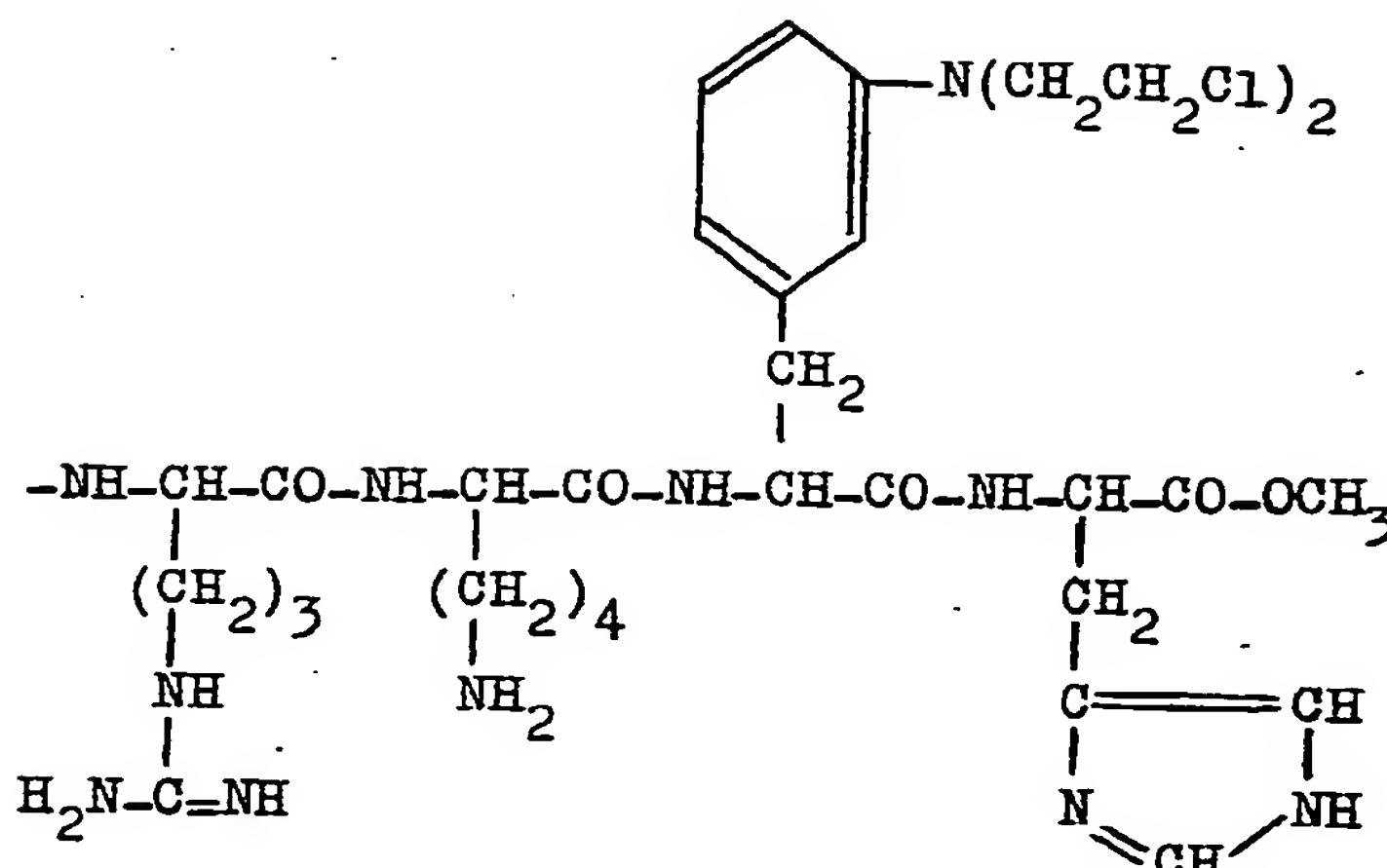
(33) (32) (31) Priorité conventionnelle : *Demande de brevet déposée aux États-d'Amérique le
11 juin 1970 n. 45.585 au nom de Augusto de Barbieri.*

L'invention concerne des peptides synthétiques dotés d'une remarquable activité dans le domaine de la chimiothérapie pour la lutte contre des tumeurs, et elle concerne également des modes opératoires pour la préparation des peptides en question.

5 En vue de réaliser une inhibition de la croissance de tumeurs aussi bien sur des êtres humains que sur d'autres animaux, des recherches approfondies se poursuivent dans de nombreux laboratoires depuis des années pour mettre au point des composés chimiques et d'autres substances actives. Bien que l'on ait enregistré quelques 10 succès partiels à la suite de telles recherches, des tumeurs continuent à résister à la plupart des traitements connus jusqu'à ce jour. On a découvert, à la suite de recherches ayant abouti à la mise au point de l'invention, que certains peptides synthétiques dont les molécules comportent certaines successions d'aminoacides possèdent 15 une efficacité surprenante quand on les utilise pour le traitement de tumeurs.

Conformément à l'invention, on a mis au point des peptides synthétiques correspondant à la formule générale suivante :





On a découvert que des mélanges de composés compris dans la portée de la formule générale ci-dessus possèdent un haut degré d'efficacité.

La formule générale indiquée ci-dessus représente une molécule de m-di(2-chloroéthyl)amino-phényl-L-alanine liée par au moins une liaison peptide à au moins un aminoacide défini dans les formules spécifiées. La (ou les) liaison(s) peptide est (ou sont) alors réalisée(s) au niveau du radical amino et/ou du radical carboxyle. Les conditions fondamentales sont les suivantes :

20 1) les aminoacides unitaires, utilisés pour la synthèse d'un peptide et incorporés à la structure peptidique, m-di(2-chloroéthyl)amino-phénylalanine incluse, doivent posséder la configuration L- ;

2) les successions peptidiques bien définies suivantes se trouvent établies :

25 a) L-proyl.m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanine

b) N, ϵ [m-di(2-chloroéthyl)amino-phényl-L-alanyl]-L-lysine

c) m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl-L-asparagine

d) p.fluoro.L-phénylalanyl-glycyl-m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl-L-norvaline

e) m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl.L-arginyl-L-lysyl-m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl-L-histidine.

30 Les substances en question sont obtenues, selon l'invention, par mise en oeuvre des techniques utilisées pour la préparation des peptides, par exemple en réalisant la condensation entre le radical carboxyle d'un des aminoacides composants et le radical amino d'un autre aminoacide estérifié, en présence de dicyclohexylcarbodiimide.
35 On peut aussi recourir à des méthodes utilisant des azides et des

anhydrides N-carboxylique... Pour protéger sélectivement les radicaux fonctionnels amino, il convient que le radical amino lui-même ait été acyclé avec de l'acide formique ou avec un chlorure de carbobenzoxyle et, dans quelques cas, ait été alcooylé avec du chlorure de trityle. 5 Les radicaux carboxyle sont protégés par estérification avec des esters de méthyle, d'éthyle, d'hexyle ou de benzyle. Finalement, les groupes de blocage sont complètement ou partiellement éliminés par hydrogénolyse catalytique, par action d'acide bromhydrique dans de l'acide acétique glacial ou d'acide chlorhydrique dans de l'éthanol, 10 et enfin par saponification. On effectue une analyse élémentaire des composés unitaires ; des atomes de chlore liés par des liaisons covalentes et ioniques (comme dans des chlorhydrates) sont dosés séparément. Le degré de pureté des produits ainsi obtenus est déterminé par chromatographie en couche mince sur silicagel G aussi bien 15 que par une mesure de l'activité optique.

Diverses modalités de mise en oeuvre de l'invention sont mieux décrites et plus faciles à comprendre grâce aux exemples suivants, qui bien entendu ne sont pas limitatifs de la portée de l'invention. Plus de 300 peptides (en plus de ceux spécifiquement décrits ici) 20 ont été préparés et tous essayés expérimentalement pour déterminer leur activité chimiothérapeutique par mise en oeuvre des modes opératoires recommandés par le C.C.N.S.C. (Cancer Chemotherapy, National Service Center, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Cancer Chemotherapy, Report n° 25, décembre 1962) en se servant, comme tumeurs d'épreuve, soit de sarcomes 180, soit d'adénocarcinomes 25 755. La seule variante consiste en ce que la détermination du poids de tumeurs sur des souris traitées par les substances à essayer et sur des animaux-témoins est effectuée un jour après le délai prescrit par le C.C.N.S.C. ; on a choisi ce mode opératoire parce qu'il 30 permet l'évaluation des leucocytes au cours du jour précédent, en vue de la détermination de l'hémotoxicité. Dans chaque expérience, on utilise un étalon de m-di(2-chloroéthyl)-aminophényl-L-alanine à quatre doses en progression géométrique, et chaque composé est lui aussi administré à quatre doses correspondant à la teneur du composé 35 sé en question en m-di(2-chloroéthyl)-aminophényl-L-alanine. Considérant l'intensité d'action par comparaison avec celle de la m-di(2-chloroéthyl)-aminophényl-L-alanine, tous les peptides ainsi préparés se classent en trois catégories :

(a) peptides dont l'effet, sur le modèle expérimental examiné, 40 est supérieur à celui de doses équimoléculaires de m-di(2-chloroéthyl)-aminophényl-L-alanine ;

(b) peptides dont l'effet est égal à celui de la m-di(2-chloro-éthyl)-aminophényl-L-alanine ;

(c) peptides dont l'effet est inférieur à celui de la m-di(2-chloroéthyl)-aminophényl-L-alanine.

5 Les recherches chimiothérapeutiques prouvent que, parmi la catégorie sus-mentionnée (a) de peptides, cinq peptides manifestent des résultats supérieurs au cours de l'expérimentation pharmacologique et les possibilités les plus prometteuses d'applications thérapeutiques en vue du traitement de la maladie néoplasique dans l'espèce 10 humaine. Ce sont des peptides compris dans la portée de l'invention.

Ci-après sont donnés différents exemples, bien entendu non limitatifs, illustrant des modes opératoires pour la préparation de cinq peptides compris dans la portée de la présente invention.

Exemple I. - Dichlorhydrate de l'ester éthylique de la L-prolyl-m-
15 [di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine (B).

A une solution chloroformique (300 ml) contenant 40 g (0,12 mole) d'ester éthylique de la m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine, on ajoute 29,9 g (0,12 mole) de N-carbobenzoxy-L-proline dissous dans 60 ml de chloroforme, puis 27 g (0,13 mole) de dicyclohexylcarbodiimide. On laisse réagir la solution résultante pendant 20 trois heures à la température ambiante ordinaire (environ 20°C) tout en l'agitant. On sépare par filtration et on rejette 14 g de dicyclohexylurée qui se sont formés. On concentre la solution sous vide jusqu'à évaporation complète du solvant. On fait passer le résidu 25 huileux résultant sur une colonne contenant du silicagel G et on procède à une élution avec un mélange chloroforme:acétone (9:1). Le produit purifié, qui est de l'ester éthylique de la N-carbobenzoxy-L-prolyl-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine, (A), se trouve initialement sous la forme d'une huile qui se solidifie après repos 30 sous de l'éther de pétrole. Rendement : 45,9 g.

Elimination du radical carbobenzoxy : 20 g de (A) dissous par chauffage - à environ 50°C - dans 200 ml d'éthanol à 5 % dans HCl sont hydrogénés en présence de 2 g de charbon palladié et 300 mg de Pd. La réduction est terminée après 10 heures à 50°C. L'addition de 35 petites quantités de catalyseur de temps en temps est nécessaire pour éviter que le dégagement de CO₂ cesse. On suit la progression de la réaction d'après le dégagement de CO₂ et, en même temps, par chromatographie en utilisant du silicagel G et un mélange solvant butanol: acide acétique:'eau 4:1:5. La détection s'effectue à l'aide de KMnO₄ 40 en milieu acide. Après la fin de la réduction, filtration sur amia.

te, précipitation du filtrat avec de l'éther anhydre, dissolution du précipité dans une petite quantité d'éthanol, on obtient 14,6 g d'un produit hygroscopique que l'on sèche dans un dessiccateur sous vide, sur P_2O_5 et NaOH. Lors de la détermination du point de fusion (P.F.), 5 on observe que le produit se décompose au-dessus de 65°C. Le produit a un indice de réfraction $[\alpha]_D^{19} = -12,5$ ($c = 2$; éthanol absolu). Le produit (B) est identifié au cours de la présente description comme étant le Produit 48/13.

10 Exemple II.- Trichlorhydrate de l'ester éthylique de la $N\epsilon$ -{m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl}-L-lysine.

On forme de l'ester éthylique de la $N\epsilon$ -{N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl}- N^{α} -formyl-L-lysine (A) en opérant de la manière décrite ci-après. On ajoute, tout en agitant, 12,4 ml de tributylamine à une solution de 22 g de N-carbobenzoxy-M-15 [di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine dans 200 ml de chloroforme, cette solution étant refroidie jusqu'à 0°C. On ajoute ensuite, goutte à goutte, 6,9 ml de chlorocarbonate d'isobutyle ; la solution ainsi obtenue est conservée trois heures à 0°C en l'agitant. On y ajoute ensuite 100 ml d'une solution chloroformique contenant 10,1 g 20 (0,05 mole) d'ester éthylique de la N^{α} -formyl-L-lysine. Après deux heures à 5°C, la solution résultante est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium, puis évaporée sous vide jusqu'à élimination complète du solvant. Le rendement en (A) est de 20,5 g ; $[\alpha]_D^{20} = +12,9$ g ($c = 2$; $CHCl_3$).

25 25 On forme ensuite de l'ester éthylique de la $N\epsilon$ -{m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl}- N^{α} -formyl-L-lysine (II). On ajoute 2 g de charbon palladié à 5 % à une suspension de 20,5 g de composé (I) à 200 ml d'éthanol absolu. La suspension résultante est hydrogénée jusqu'à cessation de dégagement de CO_2 (20 heures). La solution que l'on obtient est filtrée pour en séparer le charbon palladié, après quoi on chasse le solvant à partir du filtrat ; on recueille ainsi un produit huileux (B).

30 On forme ensuite du trichlorhydrate de l'ester éthylique de la $N\epsilon$ -{m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl}-L-lysine. La substance huileuse (B) est reprise dans 200 ml de HCl à 5 % dans de l'éthanol absolu ; on laisse reposer environ 18 heures à la température ambiante ordinaire (environ 20°C). Après évaporation du solvant sous vide, le résidu est repris avec de l'éther éthylique anhydre, après quoi on évapore l'éther. Le rendement en produit (C) est de 40 17,7 g ; $[\alpha]_D^{20} = +25$ ($c = 2$; N/10 HCl dans de l'éthanol). Le

produit reçoit la dénomination de "Produit 48/15".

Exemple III.- Acétate de m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-asparagine (B).

On prépare de l'ester benzylique de N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-asparagine (A). On prépare de l'ester benzylique de N-trityl-L-asparagine par mise en oeuvre de la méthode de Amiard et Heymes (Bull. Soc. Chim. France, 1373 (1957)). On utilise de l'ester dibenzyllique de l'acide N-trityl-L-aspartique (Velluz et al., Bull. Soc. Chim. France, 1464 (1956)) qui est ultérieurement transformé en N-trityl-L-aspartate d' α -benzyle par hydrolyse partielle avec une quantité stoechiométrique d'hydroxyde de potassium 1 N (selon la méthode d'Amiard et Heymes dont la référence bibliographique est donnée ci-dessus).

Ce dernier composé est converti en N-trityl-L-asparagine par l'action d'ammoniac et de dicyclohexylcarbodiimide. Une solution bouillante de 33,3 g de N-trityl-L-asparagine de dibenzyle (Velluz et al.) dans 180 ml de dioxane et 30 ml d'eau est traitée lentement, pendant 30 minutes, par 66 ml de KOH 1 N, après quoi on chauffe le mélange 15 minutes à reflux, on chasse le dioxane sous vide, on dilue le résidu avec de l'eau, on acidifie avec 70 ml de HCl 1 N, on extrait par CH_2Cl_2 , on lave les extraits organiques à l'eau, puis on les sèche, on concentre jusqu'à 100 ml, on traite par un courant de NH_3 jusqu'à pH 8-9, on traite par 16 g de dicyclohexylcarbodiimide, on maintient à pH 8-9 avec un lent courant de NH_3 pendant deux heures, on filtre, on évapore sous vide à 30°C, et on reprend le résidu par du méthanol pour obtenir 12 g d'ester benzylique de la N-trityl-L-asparagine. On effectue une détritylation à l'aide d'acide chlorhydrique éthanolique. Une suspension de 20,3 g (43,8 millimoles) d'ester benzylique de la N-trityl-L-asparagine dans 44 ml de HCl méthanolique 1 N est chauffée deux minutes dans de l'eau en agitant. On élimine le solvant par évaporation sous pression réduite, après quoi le résidu est d'abord lavé avec de l'éther éthylique anhydre, puis est dissous dans 100-150 ml d'éthanol bouillant. La solution est refroidie et est diluée avec deux volumes d'éther éthylique anhydre. Après quelques heures à 4°C, il se sépare un précipité cristallin blanc de chlorhydrate de l'ester benzylique de la L-asparagine. Ce précipité est recueilli sur un filtre, lavé avec de l'éther éthylique anhydre et séché sous vide dans un dessicateur sur P_2O_5 et NaOH. Rendement 10,35 g (91 %), P.F. 168-70°C (décomp.) ; analyse : N = 10,75 % (calc. 10,83), Cl^- = 13,7 % (calc. 13,7%).

Par chromatographie, on obtient le produit sous forme d'une

substance homogène.

Une suspension froide de 10,35 g de chlorhydrate d'ester benzylique de L-asparagine dans 40 ml d'eau contenant 4,2 g de carbonate de sodium est extraite cinq fois avec des fractions de 150 ml de di-5 chlorométhane froid. Les extraits organiques sont réunis, séchés sur Na_2SO_4 et évaporés sous vide jusqu'à 200 ml. Une partie aliquote de cette solution est titrée avec du perchlorate d'hydrogène dans de l'acide acétique glacial (violet cristallisé comme indicateur) afin d'évaluer la proportion de base libre (34,4 mole ; 86 %). Cette solution 10 on est ensuite réfrigérée jusqu'à -10°C et on y ajoute, tout en agitant, 15,2 g de N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine, puis 7,9 g de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. On continue à agiter à 0°C pendant cinq heures, au cours desquelles il se forme une masse gélatineuse. On dilue cette masse avec deux volumes de di-15 chlorométhane et on chauffe jusqu'au point d'ébullition. La dicyclohexylurée qui se forme est séparée par filtration, puis on évapore le filtrat à sec. Deux recristallisations du résidu à partir d'éthanol donnent 16,7 g (75 %) d'un produit blanc, (A), P.F. 140-42°C, $[\alpha]_D^{20} = +19,4^\circ$ ($c = 2$, chloroforme). Analyse : pour $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6$: trouvé : 20 N 8,70, Cl 11,2 % ; calculé : N 8,71, Cl 11,0 %.

On prépare ensuite de l'acétate de m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-asparagine (B). A un mélange de 240 ml de méthanol et 12 ml d'acide acétique glacial, on ajoute 4,5 g d'ester benzylique de la N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-asparagine (A) et 1,3 g de charbon palladié à 5 %. On soumet le mélange au passage d'un courant d'hydrogène à la température ambiante ordinaire. Après la fin de l'hydrogénolyse, ce qu'indique la cessation du dégagement de CO_2 (environ 4 heures), on sépare le catalyseur par filtration, et le filtrat légèrement coloré résultant est 25 maintenu pendant une nuit à 4°C . Au cours de ce temps, l'impureté colorée se sépare, de sorte que l'on obtient une solution limpide par filtration sur amiante. Le filtrat est concentré jusqu'à 30 ml sous vide, à une température n'excédant pas 35°C , et la solution résiduelle est lentement diluée, en agitant continuellement, avec de l'éther 30 jusqu'à obtention d'un trouble persistant. Par repos à froid, il se forme un précipité cristallin blanc (B), identifié aussi comme étant le Produit 48/22, que l'on recueille sur un filtre, lave à l'éther et sèche dans un dessiccateur sur P_2O_5 . Rendement 2,6 g (77 %) ; P.F. 126-7°C ; $[\alpha]_D^{20} = +28,4^\circ$ ($c = 2$; HCl 1 N). Chromatographie en 35 40 couche mince (silicagel G de Merck ; $\text{BuOH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{EtCOOH}$ 10:5:5:2) :

on ne décèle qu'une seule tache à l'aide d'une solution diluée de KMnO_4 . Analyse : trouvé N 11,76, Cl 14,7 % ; calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_6$: N 11,69, Cl 14,8 %.

Il est intéressant de consulter l'ouvrage de Greenstein et 5 Winitz : "Chemistry of the Amino Acids" (Chimie des aminoacides), J. Wiley & Sons, New York, 1234 (1961).

Exemple IV. - Trichlorhydrate de l'ester éthylique de la p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-norvaline. (F).

10 On forme l'ester éthylique de la N-carboxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-norvaline (A). 20,6 g (0,1 mole) de dicyclohexylcarbodiimide dans 50 ml de chloroforme sont ajoutés à une solution contenant 14,5 g (0,1 mole) d'ester éthylique de la L-norvaline et 43,90 g (0,1 mole) de N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-15 L-phénylalanine dans 150 ml de chloroforme à 20°C. Après trois heures, de la dicyclohexylurée qui s'est formée est éliminée par filtration, puis on évapore le solvant jusqu'à son élimination complète à partir du filtrat. On reprend le résidu avec de l'éther éthylique anhydre ; on évapore ensuite l'éther. Le rendement en (A) est de 20 50 g.

Elimination du radical carbobenzoxy: On traite 50 g de produit (A), en agitant, par 100 ml d'une solution saturée d'acide bromhydrique dans de l'acide acétique ; on maintient l'agitation pendant trois heures à la température ambiante ordinaire (environ 20°C). On rend 25 ultérieurement le bromhydrate insoluble en versant la solution dans de l'éther éthylique anhydre. On obtient la base en dissolvant le bromhydrate dans de l'eau, en neutralisant la solution avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis en procédant à une extraction de la base à l'aide de chloroforme (200 ml). La solution 30 chloroformique, titrée à l'aide d'acide perchlorique dans de l'acide acétique, contient 0,075 mole de dipeptide (B).

On prépare de la manière suivante l'ester éthylique de la N-carbobenzoxy-glycyl-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-norvaline (C). 15,5 g (0,075 mole) de dicyclohexylcarbodiimide dans 35 50 ml de chloroforme sont ajoutés, en agitant, à 20°C, à 200 ml d'une solution chloroformique contenant 0,075 mole de dipeptide (B) et 15,7 g (0,075 mole) de N-carbobenzoxy-glycine. La réaction résultante dure pendant environ trois heures. Après élimination, par filtration, de la dicyclohexylurée qui s'est formée et qui s'est séparée de 40 la solution résultante, on évapore le filtrat jusqu'à élimination

complète du solvant. Le produit huileux (D) est repris avec de l'éther éthylique anhydre. Le rendement est de 45 g.

Elimination du radical carbobenzoxy : On traite 40 g du produit (C) par 100 ml d'acide bromhydrique dans de l'acide acétique et on 5 maintient agité à la température ambiante ordinaire pendant trois heures. Ultérieurement, on rend le bromhydrate insoluble en versant la solution dans de l'éther éthylique anhydre. On obtient la base en dissolvant le bromhydrate dans de l'eau, en traitant par une solution saturée de bicarbonate de sodium, et en procédant à une extraction par du chloroforme (200 ml). La solution chloroformique est séchée sur sulfate de sodium puis titrée à l'aide d'acide perchlorique dans de l'acide acétique. Elle contient 0,05 mole de tripeptide (D).

On prépare ensuite l'ester éthylique de la N-formyl-p-fluoro-15 L-phénylalanyl-glycyl-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-norvaline (E). Pour cela, 10,3 g (0,05 mole) de dicyclohexylcarbodi-imide dans 100 ml de tétrahydrofurane sont ajoutés, en agitant à la température ambiante ordinaire, à une solution contenant 0,05 mole de tripeptide (D) et 10,5 g (0,05 mole) de N-formyl-p-fluoro-L-phénylalanine dans 500 ml de tétrahydrofurane. On poursuit la réaction pendant quatre heures. Après filtration et élimination de la dicyclohexylurée qui s'est formée, on évapore le filtrat et on reprend le résidu avec de l'éther éthylique anhydre. On évapore ensuite l'éther. Le rendement en produit (E) est de 25 g.

25 Elimination du radical formyle : On dissout 17 g de composé (E) dans 250 ml de HCl à 5 % dans de l'éthanol, et on laisse la solution reposer 18 heures à la température ambiante ordinaire. Le produit cristallise spontanément à partir de la solution. La filtration du produit s'effectue d'abord par lavage avec une petite quantité d'alcool froid, puis par lavage avec de l'éther éthylique anhydre. Le rendement en produit (F) ci-dessus, est de 15 g ; le produit est caractérisé par $[\alpha]_D^{20} = +39,6$ ($c = 1,5$; HCl à 5 % dans de l'éthanol). Ce produit est ci-après désigné par la dénomination : Produit 161/11.

35 Exemple V.- Ester méthylique de la m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-arginyl-L-lysyl-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-histidine.

Le produit sus-spécifié, auquel on a attribué aussi la dénomination Produit 210/B, est obtenu par copulation ou condensation des deux composés intermédiaires fondamentaux, le dipeptide et le tripeptide (Section D ci-après). L'exemple décrit dans la Section A con-

cerne la préparation du dipeptide partiellement protégé qu'est la N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-N^ω-nitro-L-arginine. L'exemple décrit dans la Section B concerne la réaction de copulation entre les di- et tri-peptides convenablement déprotégés pour aboutir au pentapeptide libre qu'est l'ester méthylique de la m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-arginy-L-lysyl-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-histidine après élimination des groupes de blocage. L'exemple décrit dans la Section C concerne la préparation du tripeptide partiellement protégé qu'est l'ester méthylique de la N-[carbobenzoxy-L-lysyl-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-histidine.

Section A : N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-N^ω-nitro-L-arginine.

Une solution de 44 g (0,1 mole) de N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine et 23 g (0,1 mole) d'ester méthylique de N^ω-nitro-L-arginine dans 300 ml de chlorure de méthylène est ajoutée à une solution de 23 g (0,11 mole) de dicyclohexylcarbodiimide dans 300 ml de chlorure de méthylène. On agite le mélange pendant trois heures à la température ambiante ordinaire. Il s'est formé et séparé, à partir du mélange réactionnel, de la dicyclohexylurée que l'on recueille sur un filtre ; à partir du filtrat, on chasse le solvant par évaporation sous pression réduite. L'épais résidu huileux résultant est solidifié par traitement avec de l'éther éthylique, et est recristallisé à partir d'éthanol.

25 Elimination du radical ester éthylique : On ajoute 11 ml (0,011 mole) d'une solution de NaOH 1 N à une solution de 6,5 g (0,01 mole) d'ester méthylique de N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-N^ω-nitro-L-arginine dans 30 ml de méthanol. On laisse la solution reposer 90 minutes à la température ambiante ordinaire. 30 On la refroidit à l'aide d'un bain de glace, puis on neutralise l'hydroxyde de sodium avec 11 ml de HCl 1 N. Le liquide surnageant résultant est séparé par décantation. Le produit gommeux résultant qui subsiste est dissous dans une petite proportion d'éthanol absolu et est précipité par de l'éther anhydre. On obtient ainsi une suspension très fine que l'on centrifuge ensuite. On décante le solvant tandis que le produit blanc résultant ainsi séparé est repris avec de l'éther et est recueilli sur un filtre.

Section B : Ester méthylique de la m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-histidine.

40 16,9 g d'ester méthylique de la L-histidine, dissous dans 100 ml

de chloroforme, sont ajoutés à 44 g de N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine et 22 g de dicyclohexylcarbodiimide. La dicyclohexylurée qui se forme est recueillie sur un filtre. On évapore le solvant à partir du filtrat, et on fait cristalliser le 5 résidu à partir d'acétate d'éthyle. Après élimination du radical carbobenzoxy à l'aide d'un traitement par HBr dans de l'acide acétique ou par mise en oeuvre du mode opératoire décrit dans l'exemple IV ci-dessus, on libère le dipeptide à partir du bromhydrate résultant à l'aide d'une solution de bicarbonate de sodium.

10 Section C : Ester méthylique de la N^ε-carbobenzoxy-L-lysyl-m-di(2-chloroéthyl)amino-L-phénylalanyl-L-histidine.

16 g d'ester méthylique de la m-di-(2-chloroéthyl)amino-L-phénylalanyl-L-histidine, dissous dans 200 ml de chloroforme, sont ajoutés à la température ambiante ordinaire à 7,2 g de dicyclohexyl-15 carbodiimide et 10,8 g de N^α-formyl-N^ε-carbobenzoxy-L-lysine dans 200 ml de chloroforme. La dicyclohexylurée qui se forme est séparée et est filtrée. Le filtrat est évaporé à sec, on reprend le résidu avec de l'éther, et on filtre. Après élimination du radical formyle par traitement avec HCl dans de l'alcool méthylique, par mise en 20 oeuvre du mode opératoire décrit dans l'exemple IV ci-dessus, le tripeptide est libéré à partir du chlorhydrate résultant par traitement par une solution de bicarbonate de sodium.

25 Section D : Hexachlorhydrate de l'ester méthylique de la m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-arginyl-L-lysyl-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-histidine.

7,18 g d'ester méthylique de la N^ε-carbobenzoxy-L-lysyl-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-histidine, dans 100 ml de chloroforme, sont ajoutés à 7 g de N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine et à 2,3 g de dicyclohexylcarbodiimide. Après dissolution, on laisse séjourner le mélange réactionnel pendant 24 heures à la température ambiante ordinaire. La dicyclohexylurée qui s'est formée est séparée et filtrée. On évape à sec le filtrat et on applique le résidu à une colonne contenant du silicagel G. On utilise comme éluant un mélange chloroforme:éthanol 9:1. Le produit est ensuite recristallisé à partir d'éthanol. Le rendement est de 6,1 g.

40 Élimination des radicaux de blocage : NO₂-carbobenzoxy : On dissout 6 g de l'ester méthylique de la N-carbobenzoxy-m-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine, N^ω-nitro-arginyl-N^ε-carbobenzoxy-L-

70 29723

12

2094175

lysyl-m-[di-(2-chlcroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-histidine dans 60 ml de HCl à 5 % dans du méthanol. On effectue l'hydrogénéation après introduction d'environ 0,5 g de charbon palladié + 0,1 g de Pd tout en agitant et en maintenant la température à 40-50°C. Après 5 24 heures, on filtre au travers d'amianté, on évapore le filtrat à sec, on reprend le résidu avec une petite quantité de méthanol et on précipite avec de l'éther anhydre ; on filtre en lavant soigneusement avec de l'éther anhydre, et on sèche sous une lampe. Le rendement en produit (Produit A) est de 4,7 g. Il se décompose au-dessus de 110°C ; son analyse donne les résultats suivants :

calculé trouvé

Cl %	28,4	28,91
Cl ⁻ %	17,0	16,89
N %	14,6	14,20

15 Section E : Ester méthylique d'un pentapeptide.

4,7 g d'hexachlorhydrate de l'ester méthylique de la *m*-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-arginyl-L-lysyl-*m*-[di-(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl-L-histidine sont dissous dans 20 ml d'alcool méthylique et traités par une solution équimoléculaire de 5 CH_3COONa dans de l'alcool méthylique. Il se forme du chlorure de sodium que l'on élimine par filtration ; à partir du filtrat, on sépare le produit par précipitation à l'aide d'éther anhydre. Rendement : 3,2 g ; P.F. : décomposition au-delà de 60°C. $[\alpha]_D^{20} = -11,9$ ($c = 1$ dans de l'alcool méthylique). Analyse :

10

	<u>calculé</u>	<u>trouvé</u>
N %	17,72	17,12
Cl %	13,8	14,13
NaCl %	-	0,8

15

Essais expérimentaux et cliniques : On procède à des essais chimio-thérapeutiques par mise en œuvre du mode opératoire recommandé par le C.C.N.S.C., lequel mode opératoire est décrit d'une manière succincte ci-dessus (à la fin de la description, avant l'exemple I), page 3. A des fins thérapeutiques, on considère qu'il convient, au lieu d'utiliser un unique peptide, de préparer un mélange des peptides sus-mentionnés, désignés ci-dessus par les dénominations abrégées 48/13, 48/15, 48/22, 161/11, 210/B, en doses équilibrées d'une manière telle qu'il se trouve 30 mg de *m*-di-(2-chloroéthyl)amino-phényl-L-alanine dans 1 ml de solution. En dépit d'un tel mode opératoire, il subsiste encore la possibilité, pour des applications en thérapeutique humaine, d'un effet favorable sélectif (dans le cas d'une tumeur sélectivement sensible à un seul peptide) amoindri ; toutefois, en raison de la difficulté de prédire la sensibilité réelle d'une tumeur donnée à un peptide défini, la présence de plusieurs peptides, dotés de sélectivités différentes, accroît la possibilité d'un effet thérapeutique favorable. Autrement dit, avec un mélange de peptides, le spectre antitumoral d'une préparation se trouve élargi. Des exemples de l'effet antitumeur, aussi bien expérimentaux que cliniques, sont donnés dans les Tableaux ci-après.

35

Comme il va de soi, et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application, non plus qu'à ceux des modes de réalisation de ses diverses parties, ayant été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes.

70 29723

2094175

Tableau I

Effet antitumoral des cinq peptides faisant l'objet de l'invention ; épreuve sur Sarcome 180. Animaux : souris. Six souris par groupe d'essai. Le traitement commence 24 heures après l'implantation. Eventail des doses : en progression géométrique. Une dose quotidienne pendant 7 jours. Les doses sont exprimées en mg de $\text{m-di-(2-chloroéthyl)amino-phenyl-L-alanine}$ contenus dans les composés injectés. Les animaux sont sacrifiés le neuvième jour. Les poids des tumeurs des animaux d'essais sont comparés à ceux constatés sur des animaux-témoins. Les résultats sont exprimés en pourcentages en pourcentages de diminution des poids de tumeurs sur les animaux traités par comparaison avec les animaux-témoins.

Composé n°	Composés	Nombre d'essais	Doses de m-L-SL en mg/kg	Mortalité morts/total	Pourcentage de régression des tumeurs	Variations %	
						Poids de la rate	Nombre de leucocytes
6/1	$\text{m-di-(2-chloroéthyl)amino-phenyl-L-alanine}$ (abrév. m-L-SL) = étaillon	> 100 > 200 > 200 > 200 > 200	2,8 4 5,6 7,84 10,98	0 0 ~ 4 % ~ 17 %	-22,59 [±] 9,21 -48,34 [±] 3,73 -69,75 [±] 8,96 -78,97 [±] 10,54 -88,54 [±] 6,49	-36,75 -49,81 -70,43 -76,24 -84,07	-69,14
48/13	L-Pro. m-L-SL .OEt.2HCl	3 3 3 3 3	2,8 5,6 7,84 10,98	0/18 0/18 4/18 8/18	-54,75 -80,43 -91,64 -95,96	-55,13 -80,79 -90,38 -95,27	-79,34
48/15	N & (m-L-SL).L-Lys.OEt.2HCl	3 3 3 3 3	2,8 4 5,6 7,84 10,98	0/18 0/18 0/18 2/18	-37,38 -69,74 -69,95 -80,73 -92,41	-43,68 -65,28 -70,25 -77,41 -82,15	-72,37
48/22	m-L-SL .L-Asn.OH.Ac-OH	3 3 3 3 3	4 5,6 7,84 10,98	0/18 0/18 0/18 2/18	-64,36 -80,96 -82,81 -93,04	-72,73 -83,25 -84,21 -88,99	-69,50

Tableau I (suite et fin)

Com- posé n°	Composés			Pourcentage de régression des tumeurs	Poids de la rate	Variations %
	Nombre d'esi- sais	Doses de m-L-SL en mg/kg	Morta- lité morts/ total			
61/1 p-F.L-Phe.Gly.m-L-SL.L-Norval. OBt.HCl	2	4	0/12	-61,37	-67,94	
	"	5,6	0/12	-80,38	-80,86	-57,61
	"	7,84	0/12	-90,26	-92,82	
210/E m-L-SL.L-Arg.L-Lys.m-L-SL.L-His. OMe	2	10,98	3/12	-95,14	-93,73	
	3	2,8	0/18	-39,58	-26,94	
	"	4	0/12	-53,69	-33,65	
	7	5,6	0/42	-66,48	-53,61	
	7	7,84	0/42	-72,83	-69,62	
	7	10,98	0/42	-84,67	-75,41	
	2	15,37	2/12	-91,78	-84,82	
	"	"	"		-59,26	

Tableau II

Effet antitumeur de mélanges de peptides.
 Systèmes d'essais : Sarcome 180 (Sa 180) et adénocarcinome 755 (Ca 755).
 Les souris sont sacrifiées le douzième jour. Une dose quotidienement pendant sept jours.
 Toutes les autres conditions expérimentales sont les mêmes que pour le Tableau I

Composés	Doses (mg/kg) en m-L-SI	Régression des tumeurs (%)		Mortalité (morts/total)		Diminution % du poids de la rate		Diminution du nombre des Leucocytes	
		Sa 180		Ca 755		Sa 180		Ca 755	
		Sa 180	Ca 755	Sa 180	Ca 755	Sa 180	Ca 755	Sa 180	Ca 755
700.119	4	-45,65	-86,44	0/6	0/6	-45,83	-25,45	-56,17	-49,67
	5,6	-70,37	-90,76	0/6	0/6	-62,50	-54,46		
	7,84	-81,64	-92,07	0/6	1/6	-73,15	-74,11		
	10,98	-92,26	-93,38	1/6	2/6	-86,11	-79,91		
700.120	4	-66,25	-88,43	0/6	0/6	-62,04	-31,25	-57,99	-50,65
	5,6	-79,12	-92,94	0/6	0/6	-73,61	-64,29		
	7,84	-81,27	-93,94	0/6	1/6	-77,78	-75,00		
	10,98	-92,67	-94,84	3/6	3/6	-86,11	-73,21		
700.416	4	-53,20	0/6	-70,81	-70,81	-26,25	-65,62		
	5,6	-77,43	0/6			-76,87	-85,00		
	7,84	-84,46	0/6			-	-		
	10,98	-93,48	2/6			-	-		

Tableau III

Effet du mélange de peptides (48/13 + 48/15 + 48/22 + 161/11 + 210/B) sur quelques patients humains atteints de maladies néoplasiques.

Doses : une demi-ampoule ou une ampoule (1 ampoule = 1 ml = 30 mg de m-di-(2-chloroéthyl)amino-phényl-L-alanine dans l'association des peptides sus-mentionnés) dissoute dans 250 ml de glucose à 5 %.

Administration : phlébolyse lente (durée de la phlébolyse : de 70 à 80 minutes) tous les deux jours ou à intervalles plus espacés (deux à trois jours entre deux administrations consécutives) selon le degré de tolérance des individus.

Ini- tiales	Age	Sexe	Diagnos- tic et état au début du traite- ment par le mélange de peptides	Traitements antérieurs	Résultats avec le mélange de peptides		Remarques
					Total de mg injec- tés *	Effets cliniques	
G.P.	38	F.	Maladie de Hodgkin	pas de tra- tement anté- rieur	240	Disparition de la fi- èvre et du gonflement des ganglions lym- phatiques	Diminution des leucocytes = 42 % hématoïdes : pas de modification
F.M.	68	F.	Maladie de Hodgkin		180	guérison clinique (4 semaines de tra- tement)	diminution des leucocytes de 10000 à 4000/mm ³ Disparition de la fièvre le 7ème jour
B.M.	32	F.	Maladie de Hodgkin		120	Disparition complète des lymphomes	Diminution des leucocytes = 33 %
P.P.	25	M.	Maladie de Hodgkin (localisation médi- astinale)		270	Amélioration clinique et radiologique	Disparition de la fièvre le 7ème jour Indice Katz : avant 80, après 25
D.A.	59	F.	carcinome ovarien inopérable ; plusieurs masses dans le bassin et le mésentère. As- cite apparente et abondante effusion pleurelle à droite	Leukeran Endoxan	90	Amélioration frap- ante de l'état général. Réabsorption d'effu- sions. Remarquable diminution d'oedème ; perte de poids = 10 kg	Leucopénie jusqu'à 2000 leucocytes par mm ³ . Pas de changements dans les thrombocytes ni dans les hema- tites

Tableau III (suite)

Individuelles	Age	Sexe	Diagnostic et état au début du traitement par le mélange de peptides	Traitements antérieurs	Résultats avec le mélange de peptides		
					Total de mg injectés *	Effets cliniques	Remarques
G.N.	66	F.	Métaстases péritonales diffuses après carcinome ovarien		105	Remarquable amélioration	Diminution des leucocytes par mm ³ = 62,5 % ; valeur finale des hématies 4 800 000
S.G.	61	F.	Microcytome pulmonaire avec métastases de la peau et du médiastin	Rayons X Chloramine Endoxan Tem Méthotrexate Prednisolone	210	Amélioration frappante avec disparition de l'œdème et des métastases médiastinales	Diminution de la vitesse de sédimentation. Diminution des leucocytes = 25 %. Hématies : pas de modification
D.M.	64	M.	Métaстases dans le foie de microcytomes pulmonaires	Méthotrexate	180	Diminution frappante des métastases dans le foie	Diminution des leucocytes = 60 %
S.S.	63	M.	Microcytomes du poumon droit avec métastases lymphoglandulaires. Dotteuse continue		180	Disparition complète de la douleur. Pas d'effet prouvé sur la tumeur	Diminution des leucocytes = 40 % Hématies 4 200 000 Poids : non modifié
M.G.	65	M.	Tumeur du poumon gauche		120	Nette amélioration prouvée radiologiquement	Pas de modification des leucocytes
F.G.	63	M.	Tumeur pulmonaire avec cellules non-différenciées		150	Diminution de 90 % en 3 semaines de la masse fièvre ; diminution de la tumeur (radiologiquement prouvée)	Disparition de la fièvre ; diminution des leucocytes 33 % Augmentation de poids de 3 kg

Tableau III (suite)

Initiales	Age	Sexe	Diagnostic et état au début du traitement par le mélange de peptides	Résultats avec le mélange de peptides		
				Total de mg injectés *	Effets cliniques	Remarques
T.G.	63	M.	Tumeur médiastinale du poumon droit	120	Disparition de la symptomatologie morbide. Amélioration de l'image radiologique pulmonaire	Amélioration de l'état général. Augmentation de poids 2,5kg. Pas de modification leucocytaire.
M.F.	62	M.	Carcinome scilide infiltrant de la vessie avec cellules non-différenciées. Type III	300	Amélioration clinique (3 mois)	Alopécie (réversible). Pas d'autres troubles.
F.R.	54	M.	Carcinome anaplasique infiltrant de la vessie. Type III	660	Pas d'effet	Nausées avec vomissements ; alopecie totale. Tous effets secondaires réversibles.
R.F.	77	M.	Tumeur hétéroplastique de la vessie avec métastases osseuses	180	Amélioration significative d'un patient dont l'état était très grave	Pas de modification des hématies. Diminution de la vitesse de sédimentation. Diminution des leucocytes = 52 %
S.A.	58	M.	Carcinome papillaire de la vessie. Type II Stade T1 avec cellules de transition.	300	Régression partielle (50 %). Contrôle cytoscopique après 5 mois : le patient est apparemment guéri.	Nausées, anorexie. Alopécie (réversible).

Tableau III (suite)

Ini- tiales	Age	Sexe	Diagnostic et état au début du traitement par le mélange de peptides	Traitements antérieurs	Résultats avec le mélange de peptides	
				Total de mg injectés *	Effets cliniques	
G.B.	63	M.	Carolinome prostatique infiltrant. Stade II ⁴ . Métaстases lymphatiques multiples. Type III.	Orchies-tomie Oestrogènes Endoxan	300 Amélioration subjective. Régression totale des métastases	Pas d'effets secondaires. Pas d'effets secondaires.
S.B.	69	M.	Carcinome prostatique avec métastases osseuses.	Oestrogènes Methotrexate Chimiothérapie combinée (Tem-Endoxan Thiotepa Prednisolone)	180 Amélioration de l'état clinique. Disparition de la douleur	Diminution des leucocytes = 68 %
G.M.	70	F.	Tumeur mammaire avec métastases de la peau ulcérée		105 Remarquable amélioration des lésions de la peau	Diminution des leucocytes = 62,5 %
G.B.	52	F.	Nodule mammaire hétéroplastique gauche après mammectomie droite pour des métastases d'un carcinome du foie		105 Disparition des douleurs mammaires et au niveau du foie	Amélioration de l'état général. Pas de modification des leucocytes
A.E.	60	F.	Réticulolo-sarcome de la rate. Etat très grave		135 Pas d'amélioration.	Température à baissé 1 ^{er} 3 ^{ème} jour; 11 ^{ème} 3 ^{ème} jour est en moyenne; 3 ^{ème} du 5 ^{ème} au 7 ^{ème} puis s'élève jusqu'à 38-39°C jusqu'au décès.

70 29723

2094175

Tableau III (suite et fin)

Initiales	Age	Sexe	Diagnostic et état au début du traitement par le mélange de peptides	Résultats avec le mélange de peptides		
				Traitements antérieurs	Total de mg injectés *	Effets cliniques
B.W.	63	M.	Réticuloso-sarcome. Plusieurs lymphomes cervicaux, axillaires, inguinaux bilatéraux	Moutarde à l'azote	180	Disparition complète des lymphomes
M.A.	62	F.	Carcinome pancréatique		60	Etat non-modifié
G.A.	72	M.	Tumeur gastrique avec métastases hépatiques		195	Remarquable diminution de la masse néoplasique

On observe l'absence totale de lymphomes après 19 jours de traitement

Nombre de leucocytes avant : 5000 après : 2500

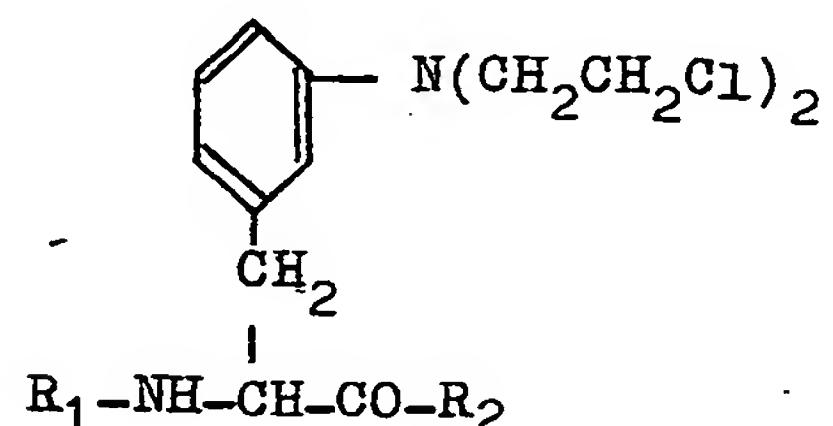
Nombre de leucocytes avant : 6000 ; 1^e 5^e jour 16000 ; du 10^e au 14^e j. 12000 ; 1^e 27^e j. 4000.

Disparition de la fièvre le 14^e jour

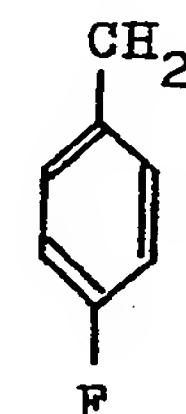
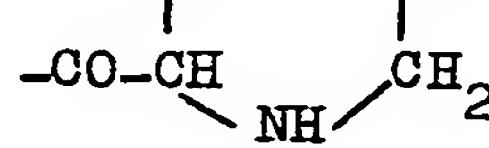
* Exprimé en milligrammes de m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanine se trouvant dans le mélange de peptides utilisé

Revendications

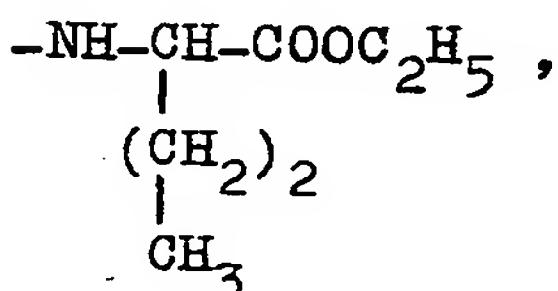
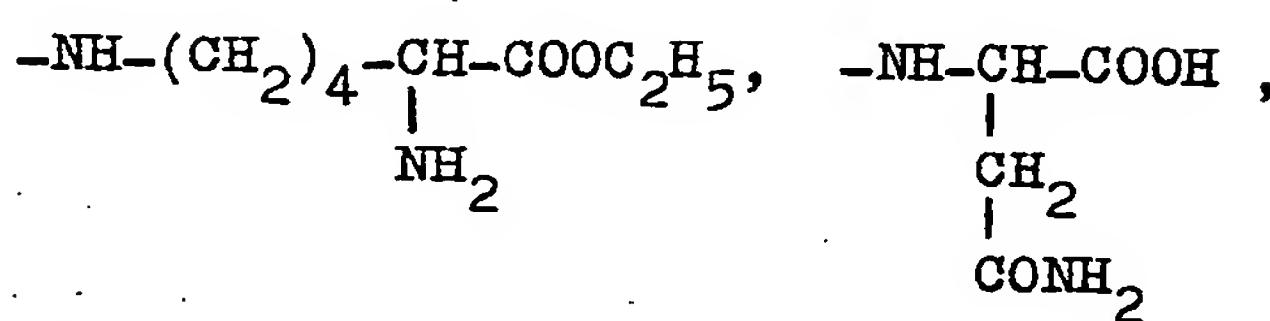
1. Composé possédant la formule générale suivante :



dans laquelle R_1 représente $-\text{H}$, CH_2-CH_2 ou $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

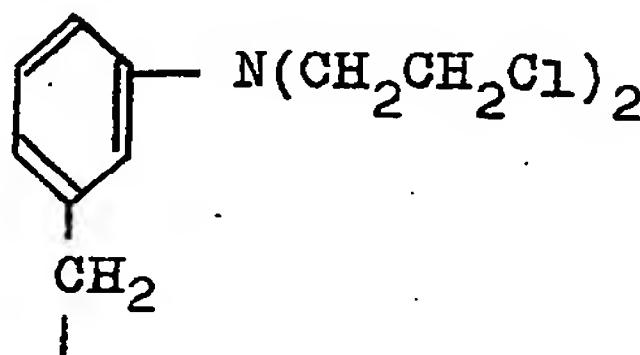


R_2 représente $-\text{OH}$, $-\text{OX}$ (X est $-\text{CH}_3$ ou $-\text{C}_2\text{H}_5$),

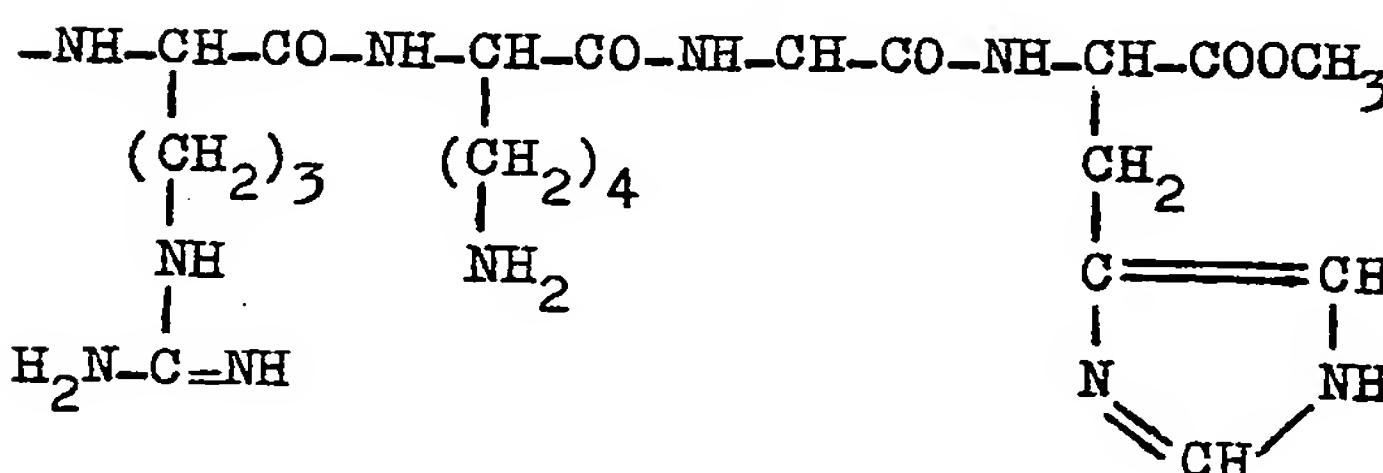


15

ou



20



2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que sa molécule comporte la succession peptidique suivante : ester éthyl-
25 que de la L-prolyl-m-di(2-chloroéthyl)-amino-L-phénylalanine.

3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que sa molécule comporte la succession peptidique suivante : ester éthyl-

que de la N, ϵ {m-di(2-chloroéthyl)-amino]-L-phényl-alanyl}-L-lysine.

4. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que sa molécule comporte la succession peptidique suivante : ester éthylique de la m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl-L-asparagine.

5 5. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que sa molécule comporte la succession peptidique suivante : ester éthylique de la p-fluoro-L-phénylalanyl-glycyl-m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl-L-norvaline.

6. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que sa 10 molécule comporte la succession peptidique suivante : ester méthylique de la m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl-L-arginyl-L-lysyl-m-di(2-chloroéthyl)-amino-phényl-L-alanyl-L-histidine.

7. Composition caractérisée en ce qu'elle contient un mélange de composés possédant la formule générale spécifiée dans la revendication 1.

8. Composition caractérisée en ce qu'elle contient un mélange des composés respectivement spécifiés dans les revendications 2, 3, 4, 5 et 6.

9. Procédé pour le traitement de tumeurs sur des animaux, y 20 compris des êtres humains, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à administrer, à un hôte, une quantité pharmacologique d'un composé selon la revendication 1.

10. Procédé pour le traitement de tumeurs sur des animaux, y compris des êtres humains, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à administrer, à un hôte, une quantité pharmacologique d'une composition selon la revendication 8.

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox

THIS PAGE BLANK (USPTO)